

## Germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* en medios de cultivo semisólidos

Raúl Collado\*, Raúl Barbón, Daniel Agramonte, Felipe Jiménez, Martha Pérez, Odalys Gutiérrez \* Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. CP 54 830. Cuba. [raulc05@ibp.co.cu](mailto:raulc05@ibp.co.cu); [racollado76@yahoo.es](mailto:racollado76@yahoo.es)

### RESUMEN

Con el objetivo de establecer un medio de cultivo y determinar el tiempo de cultivo para la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King, se realizó este trabajo. Embriones somáticos en etapa cotiledonal fueron colocados en un medio de cultivo compuesto por la mitad de las sales MS. Se estudiaron tres concentraciones de 6-BAP (0.2, 0.4 y 0.6 mg.l<sup>-1</sup>), dos concentraciones de AG<sub>3</sub> (1.0 y 2.0 mg.l<sup>-1</sup>) y un medio de cultivo control sin reguladores de crecimiento. En el medio de cultivo que se obtuvieron los mejores resultados, se estudió el efecto del tiempo de cultivo (30, 60 y 90 días de cultivo) sobre la germinación de embriones somáticos. El mayor número de embriones somáticos con germinación total se obtuvo en el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Cuando se le adicionaron al medio de cultivo 0.6 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP se presentó el valor más alto de embriones somáticos con embriogénesis secundaria. El aumento del tiempo de cultivo a 60 y 90 días incrementó significativamente la germinación total de los embriones somáticos. Estos resultados permitieron definir un medio de cultivo para la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* compuesto por la mitad de las sales MS sin reguladores de crecimiento con un tiempo de cultivo de 60 días.

Palabras clave: caoba, cultivo *in vitro*, embriogénesis somática, regeneración

### ABSTRACT

With the objective to establish a suitable culture medium and to determine the optimum culture time for the germination of somatic embryos of *Swietenia macrophylla* King, it was carried out these work. Somatic embryos at the cotyledonal stage were placed in a culture medium formed by the half of the MS salts for their germination. three concentrations of 6-BAP (0.2, 0.4 and 0.6 mg.l<sup>-1</sup>), two concentrations of AG<sub>3</sub> (1.0 and 2.0 mg.l<sup>-1</sup>) and a culture medium control without growth regulators were studied. In the culture medium where the best results were obtained, the effect of the culture time on the germination of somatic embryos (30, 60 and 90 days of culture) was studied. The major number of somatic embryos with total germination was obtained in the culture medium without growth regulators, with significant differences to the rest of the treatments. The highest value of somatic embryos with secondary embryogenesis was presented when 0.6 mg.l<sup>-1</sup> of 6-BAP were added to the culture medium. The increase of the culture time to 60 and 90 days increased significantly the total germination of the somatic embryos. These results allowed to define a culture medium for the germination of somatic embryos of *Swietenia macrophylla* King composed by the half of the MS salts without growth regulators with a culture time of 60 days.

Key words: *in vitro* culture, Mahogany, regeneration, somatic embryogenesis

### INTRODUCCIÓN

Dentro de las especies agroforestales de mayor importancia para Cuba y el mundo se encuentra la caoba. La acelerada disminución de sus ejemplares debido a la calidad de su madera y al alto valor comercial de esta especie ha desencadenado la búsqueda de alternativas como la utilización de técnicas biotecnológicas con vista a la propagación clonal *in vitro* (Medina y Sotolongo, 2004).

La morfogénesis vía embriogénesis somática es una herramienta de gran utilidad para la propagación masiva de plantas ya que permite incrementar los volúmenes de producción y disminuir los costos de la misma. En especies leñosas como la caoba donde la propagación por organogénesis ha tenido poco o

ningún desarrollo, debido a los grandes problemas de contaminación microbiana y a los bajos índices de regeneración de plantas *in vitro*, esta técnica constituye un método alternativo para la micropropagación de esta especie.

Aunque en la mayoría de las referencias bibliográficas sobre embriogénesis somática de especies leñosas no se ofrece mucha información sobre la germinación y conversión en plantas de los embriones somáticos, se sabe que las bajas tasas de regeneración de plantas son causadas por problemas en la germinación y conversión de los embriones somáticos (Sarraz et al., 2004; Vilchez et al., 2004).

Según Parrot (2002) la histodiferenciación, maduración desecación y germinación de los

embriones somáticos de angiospermas ocurren sin la presencia de reguladores de crecimiento exógenos. Aun así, muchos de los protocolos para la embriogénesis somática omiten una o más etapas, usan reguladores de crecimiento innecesarios, o condiciones subóptimas de cultivo. Como resultado, los embriones somáticos requieren el uso de reguladores de crecimiento (generalmente citoquinina, ácido abscísico, o giberelina) antes de germinar.

En cultivos como la guayaba se ha registrado una tasa de germinación de los embriones *in vitro* de 82% con el uso de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y un análogo de brasinoesteroide (Biobras 6) en concentraciones de 0.25 mg.l<sup>-1</sup> y 10 mg.l<sup>-1</sup> respectivamente, bajo condiciones de luz solar (Vilchez *et al.*, 2001). Sin embargo, en *Swietenia macrophylla* King no se ha encontrado información en la literatura científica consultada sobre la germinación de embriones somáticos.

Las necesidades de desarrollar la fase de germinación en la embriogénesis somática de esta especie decidieron la realización de este trabajo que persiguió el objetivo de establecer un medio de cultivo y determinar el tiempo de cultivo para la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Propagación masiva del Instituto de Biotecnología de las Plantas.

### Material vegetal

Se utilizaron embriones somáticos en etapa cotiledonal formados en un medio de cultivo compuesto por la mitad de las sales Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con ácido nicotínico 1.0 mg.l<sup>-1</sup>, piridoxina 1.0 mg.l<sup>-1</sup>, 6-BAP 1.0 mg.l<sup>-1</sup> y sacarosa 3.0% , para lo cual se empleó la metodología desarrollada por Collado *et al.* (2005).

### Efecto del 6-BAP y el ácido giberélico sobre la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King

Los embriones somáticos fueron situados en un medio de cultivo de germinación formado por la mitad de las sales MS, al cual se le añadieron las vitaminas MS 10 ml.l<sup>-1</sup>, 2.0 % de sacarosa, 3.0 g.l<sup>-1</sup> de Gelrite y el pH fue ajustado a 5.8, antes del autoclaveado.

Se estudiaron tres concentraciones de 6-BAP (0.2, 0.4 y 0.6 mg.l<sup>-1</sup>), dos concentraciones de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) (1.0 y 2.0 mg.l<sup>-1</sup>) y se empleó como control un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. Fueron evaluadas las siguientes variables:

- Número de embriones somáticos con embriogénesis secundaria.

- Número de embriones con germinación total (el embrión emite radícula y brote).
- Número de embriones con germinación parcial (el embrión emite radícula o brote).

### Efecto del tiempo de cultivo sobre la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King

Se estudió el efecto del tiempo de cultivo sobre la germinación de embriones somáticos de caoba (30, 60 y 90 días de cultivo). Cada 30 días los embriones somáticos se colocaron en medio de cultivo fresco. Para el desarrollo de este experimento se empleó el medio de cultivo del experimento anterior con el que se obtuvieron los mejores resultados y se evaluaron las variables: número de embriones con germinación total y número de embriones con germinación parcial.

En ambos experimentos fueron colocados cinco embriones somáticos por recipiente de cultivo (frascos de vidrio de 250 ml de capacidad) y 20 frascos por tratamiento, se realizaron cuatro repeticiones.

Los experimentos se desarrollaron en una cámara de cultivo con luz solar, a temperatura de 26.0°C ± 2.0 y con una intensidad luminosa entre 48.0 y 62.5 μmol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 9.0 para Windows. A los datos se les realizaron ANOVA de clasificación simple con homogeneidad de varianza. Las diferencias entre las medias fueron determinadas mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan, para una significación del 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto del 6-BAP y el ácido giberélico sobre la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King

En la tabla 1 se puede observar que el mayor número de embriones somáticos con germinación total se obtuvo en el medio de cultivo control con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Los valores de esta variable disminuyeron con el incremento de las concentraciones de 6-BAP y no se observó respuesta cuando se le añadió al medio de cultivo AG<sub>3</sub>.

Diversos autores han señalado que la adición de 6-BAP al medio de cultivo incrementa la germinación total de los embriones somáticos (Barbón *et al.*, 2002; Vilchez *et al.*, 2004). Sin embargo, en el caso de la *Swietenia macrophylla* King, los datos obtenidos indicaron que las concentraciones de 6-BAP añadidas al medio de cultivo afectaron negativamente la germinación de los embriones somáticos y se demostró que los mejores resultados en esta etapa se presentaron en el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento.

Al igual que ocurrió con el número de embriones somáticos con germinación total, el número de embriones somáticos con germinación parcial disminuyó con el incremento de las concentraciones de 6-BAP. Es importante destacar que en los tratamientos donde se le agregó al medio de cultivo  $AG_3$  los embriones somáticos solamente emitieron brotes y en el resto se formaron plantas completas.

Varios autores han mencionado que con el empleo de bajas concentraciones ( $1.0 - 2.0 \text{ mg.l}^{-1}$ ) de  $AG_3$  lograron romper el estado de latencia de los embriones somáticos e incrementaron la germinación de los mismos en especies como: *Hyophorbe lagenicaulis* (Sarasan *et al.*, 2002), *Siberian ginseng* (Choi *et al.*, 2003) y *Gossipyum hirsutum* (Kumria *et al.*, 2003). Dicho criterio no fue corroborado en este trabajo ya que las dos concentraciones de  $AG_3$  probadas ( $1.0$  y  $2.0 \text{ mg.l}^{-1}$ ) solo estimularon el desarrollo de brotes en los embriones somáticos e inhibieron la emisión de raíces.

Los resultados mencionados anteriormente confirmaron el planteamiento de Parrott (2002) relacionado con que la germinación de los embriones somáticos puede ocurrir sin la presencia de reguladores de crecimiento.

Fueron observados valores altos para el número de embriones somáticos con embriogénesis secundaria en todos los tratamientos, pero el mayor valor de esta variable se alcanzó cuando se le adicionaron al medio de cultivo  $0.6 \text{ mg.l}^{-1}$  de 6-BAP (Tabla 1). Con este resultado se demostró que en la especie *Swietenia macrophylla* King la embriogénesis somática repetitiva puede ocurrir en ausencia de auxina exógena.

Cuando los embriones somáticos se pusieron en contacto con el 6-BAP se multiplicaron e incrementaron los valores de embriogénesis secundaria. Este resultado coincidió con Parrott (2002) que informó que existen especies donde la embriogénesis repetitiva puede ocurrir en ausencia

de toda auxina externa y que este ciclo puede ser difícil o imposible de romper. Además, este mismo autor señaló que los embriones somáticos están formados por células embriogénicas predeterminadas que al ponerse en contacto con una citoquinina, pueden dividirse de forma independiente y formar otros embriones somáticos.

### Efecto del tiempo de cultivo sobre la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King

Al comparar el efecto del tiempo de cultivo sobre la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King, se demostró que con el aumento del tiempo de cultivo a 60 y 90 días se obtuvieron los mejores resultados respecto a la germinación total de los embriones somáticos. Estos tratamientos no difirieron significativamente entre ellos, pero fueron superiores al tiempo de 30 días (Tabla 2).

Se comprobó que 30 días en el medio de cultivo para la germinación no fueron suficientes para lograr la germinación de más del 55% de los embriones somáticos. Para incrementarla hasta cerca de un 80% se necesitó del doble o el triple del tiempo de cultivo. Ello puede ser un indicativo de que se requieren periodos de tiempo de cultivo más largos para completar la madurez fisiológica a un mayor número de embriones somáticos. Resultados similares fueron obtenidos por Tisserat *et al.* (2000) los cuales plantearon que en embriones somáticos de *Pinus radiata* al incrementar el tiempo de cultivo a seis y ocho semanas obtuvieron los valores más altos de germinación total.

Las plantas *in vitro* regeneradas a partir de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King a los 60 días en el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento alcanzaron una altura de 3.0 – 5.0 cm, presencia de raíz definida y de tres a cinco hojas verdaderas (Figura 1).

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP y  $AG_3$  sobre la germinación de embriones somáticos en *Swietenia macrophylla*.

Tratamientos	No. ESGT	No. ESEs	No. ESGP
0.2 $\text{mg.l}^{-1}$ 6-BAP	19.34 b	45.53 c	11.54 b
0.4 $\text{mg.l}^{-1}$ 6-BAP	16.19 c	53.43 b	6.26 c
0.6 $\text{mg.l}^{-1}$ 6-BAP	5.17 d	79.36 a	2.85 d
1 $\text{mg.l}^{-1}$ $AG_3$	0.00	38.33 de	1.83 e
2 $\text{mg.l}^{-1}$ $AG_3$	0.00	37.15 e	1.12 e
Control	57.62 a	40.17 d	13.35 a
E. E.	$\pm 0.51$	$\pm 0.62$	$\pm 0.26$

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren estadísticamente según Duncan para ( $p < 0.05$ ). E.E. error estándar. No. ESEs: número de embriones somáticos con embriogénesis secundaria. No. ESGT: número de embriones somáticos con germinación total. No. ESGP: número de embriones somáticos con germinación parcial.

Tabla 2. Efecto del tiempo de cultivo sobre la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King.

Tratamientos (días)	No. ESGT	No. ESGP
30	55.31b	14.15 b
60	76.19 a	9.34 a
90	78.24 a	8.29 a
E. E.	±2.03	± 0.91

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren estadísticamente según Duncan para ( $p < 0.05$ ). E.E. error estándar. No. ESGT: número de embriones somáticos con germinación total. No. ESGP: número de embriones somáticos con germinación parcial.

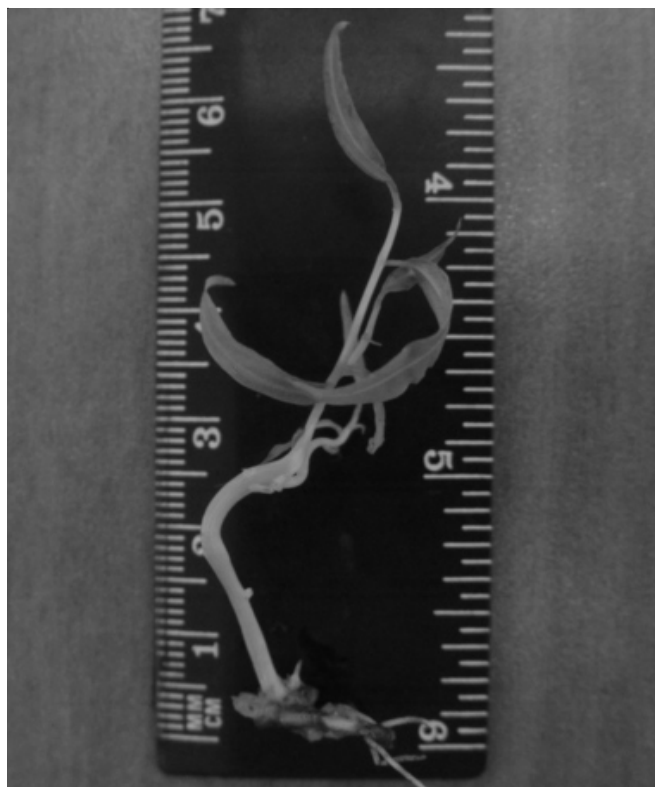


Figura 1. Plantas *in vitro* regeneradas a partir de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King después de 60 días en el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento.

## CONCLUSIONES

Se estableció un medio de cultivo para la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King compuesto por la mitad de las sales MS sin reguladores del crecimiento.

Se logró incrementar el número de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King con germinación total con el aumento del tiempo de cultivo de 30 a 60 y 90 días.

## REFERENCIAS

- Barbón, R, Jiménez E, De Fera M, Quiala E, Capote A, Chávez M (2002) Influencia del genotipo y la densidad de inoculación sobre la diferenciación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo y *Coffea canephora* cv. Robusta. *Biotechnología Vegetal* 3: 145-148
- Choi, Y, Jeong J (2002) Dormancy induction of somatic embryos of Siberian ginseng by high sucrose concentrations enhances the conservation of hydrated artificial seeds and dehydration resistance. *Plant Cell Rep.* 20:1112–1116
- Collado, R, Barbón R, Agramonte D, Jiménez F, Pérez M, Gutierrez O (2005) Diferenciación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King en medio de cultivo semisólido. En: *Memorias Congreso Internacional Biotecnología Agrícola (BioVeg 2005)*. Ciego de Avila. Cuba
- Kumria, R, Sunnichan V, Das D, Gupta S, Reddy V, Bhatnagar R, Leelavathi S (2003) High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. *Plant Cell Rep.* 21: 635–639
- Medina, M, Sotolongo R (2004) Avances en el cultivo de tejidos de *Swietenia macrophylla* King. X *Swietenia mahogani* Jacq. *Revista Forestal Baracoa* (2) 23: 19-26
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 15: 473-497

- Parrott, W (2002) La embriogénesis somática en los angiospermas. En: Resúmenes: VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal, Santa Clara, Cuba. 156p
- Tisserat, B, Eskins K, Kaphammer B, Tull G, Wann R (2000) Utility-high carbon dioxide and light quality and quantity in woody plant propagation. United States Patent 6,060,314
- Vilchez, J, Albany N, León de Sierralta S (2004) Micropropagación de guayabo ( *Psidium guajava* L.). En: Libro de Reportes cortos: VIII Congreso Venezolano de Fruticultura, Venezuela. 27p.
- Vilchez, J, Albany N, Gómez R, García L, Agramonte D (2001) Germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. cv. Enana Roja Cubana EEA 18-40 en sistemas de inmersión temporal. Biotecnología Vegetal 1(2):67-69
- Sarfraz, S, Husnain T, Riazuddin S (2004) Somatic Embryo Germination and Plant Development from Immature Zygotic Embryos in Cotton. Pakistan Journal of Biological Sciences (7) 11: 1946-1949
- Sarasan, V, Ramsay M, Roberts A (2002) *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in 'Bottle Palm' [*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H.E. Moore], a critically endangered Mauritian palm. Plant Cell Rep 20:1107–1111